Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate) 2003. pp. 47-53.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA Y MOLECULAR DE CULTIVARES DE AGUACATERO (*PERSEA AMERICANA* MILL.) EN CUBA

N. N. Rodríguez-Medina[1], W. Rohde[2], C. González-Arencibia[3], I. M. Ramírez-Pérez[4], J. L. Fuentes-Lorenzo[4], M. A. Román-Gutierrez[3], X. Xiqués-Martín[3], D. Becker[2] y J. B. Velázquez-Palenzuela[1].

[1]Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave 7ma NO. 3005, e/ 30 y 32, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. e-mail: iicif@ceniai.inf.cu.

[2]Max-Planck-Institut für Züchtngsforschung. Carl-von-Linné-Weg 10, D 50829, Köln, Germany. e. mail: rohde@mpiz-koeln.mpg.de

[3]Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 e/ I y J, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. e. mail: cglez@fbio.uh.cu.

[4]Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear. Calle 30 No. 502 e/ 5ta y 7ma, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. e. mail: fuentes@ceaden.edu.cu

RESUMEN

Se realizó la caracterización morfoagronómica, isoenzimática y molecular en aguacateros (*Persea americana* Mill.) de la colección del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical de Cuba. Para ello se emplearon los descriptores establecidos por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, tres sistemas enzimáticos: peroxidasas, polifenol oxidasa y ascorbato oxidasa y la técnica de ISTR (Inverse Sequense-Tagged Repeat), respectivamente. A través de la matriz de correlaciones, el análisis de componentes principales realizado con las variables 'color de las lenticelas del vástago joven'; 'olor a anís en las hojas'; 'longitud del pedúnculo'; 'superficie', 'grosor' y 'flexibilidad de la cáscara del fruto' y 'época de cosecha', permitió el agrupamiento de cultivares en los grupos ecológicos presumibles. Los considerados como híbridos de Guatemalteco x Antillano quedaron incluidos dentro de los Guatemaltecos. El análisis genético con los tres sistemas enzimáticos, se basó en las variables 'número total de loci', 'total de bandas o alelos', 'total de alelos raros', 'valor medio de alelos por locus', 'porcentaje de loci polimórficos'y 'valor medio de alelos por loci polimórficos'. Se determinó la matriz de similitud a través del índice de Zcekanowski. El análisis de conglomerados determinó la formación de cinco grupos, con una gran similitud en la mayoría de los cultivares de origen Antillano y mayor variabilidad para los de origen Guatemal-

teco y algunos híbridos. Se determinó la alta eficiencia de la técnica de ISTR para la detección del polimorfismo dentro de los genotipos seleccionados. Aunque el análisis de conglomerados no permitió el agrupamiento adecuado de los cultivares en sus grupos ecológicos posiblemente a que se utilizó una sola combinación de primer (F_3 + B_2B), se registró un 100% de bandas polimórficas. Los análisis de isoenzimas y del marcador de ADN utilizado, brindaron patrones de bandas específicos que permiten la identificación de los cultivares estudiados y el nivel de variabilidad genética de los mismos, resultados que pueden o no coincidir con los análisis que utilizan variables morfoagronómicas de selección antrópica para el agrupamiento de los cultivares según su grupo ecológico.

Palabras Clave: Aguacatero, caracteres morfológicos, isoenzimas, marcadores de ADN, Grupos Ecológicos.

INTRODUCCIÓN

En el aguacatero, existen tres Grupos Ecológicos o Razas Hortícolas: Mexicano, Guatemalteco y Antillano. Estos grupos se diferencian en su época de floración, época de recolección, contenido de aceite en la pulpa, tipo de corteza y resistencia al frío. Los caracteres morfológicos se han empleado con mayor o menor efectividad para la identificación de estos grupos (Lima *et al.*, 1988; Rodríguez *et al.*, 2000), sin embargo, cuando estamos en presencia de híbridos naturales entre Razas Hortícolas diferentes, resulta difícil su ubicación (Lima *et al.*, 1988).

Los marcadores genéticos son entidades heredables que están asociados a caracteres de importancia económica, que se han utilizado en la selección y evaluación de los bancos de germoplasma para diferentes cultivos (Staub *et al.*, 1982; Darvasi y Soller, 1994). Los estudios del polimorfismo isoenzimático y del ADN en el aguacatero se han aplicado para garantizar el conocimiento y mantenimiento de la diversidad genética presente en las colecciones y en la caracterización de loci potencialmente marcadores, que pueden ser utilizados dentro de los programas de mejoramiento genético (Clegg *et al.*, 1999, González *et al.*, 2002; Ramírez *et al.*, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal:

Los cultivares de aguacatero considerados (Tabla 1) pertenecen a las colecciones de la Unidad Científico Tecnológica de Base del Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, en el municipio de Alquízar, provincia de La Habana, Cuba.

Caracterización morfoagronómica:

Se determinaron 92 caracteres morfoagronómicos y se seleccionaron siete de ellos: 'color de las lenticelas del vástago joven'; 'olor a anís en las hojas'; 'longitud del pedúnculo'; 'superficie', 'grosor' y 'flexibilidad de la cáscara del fruto' y 'época de cosecha'. Con el empleo del paquete de programa NTSYS-pc se realizó un análisis de componentes principales, a partir de la matriz de correlaciones.

Caracterización bioquímica:

Se tomaron muestras foliares de 20 cultivares de aguacatero de los referidos en la Tabla 1 para la caracterización isoenzimática. Se empleó un sistema de corrida vertical y buffer discontinuos (González y González, 1981). El gel de separación fue de 8,5% de poliacrilamida (PAGE) y buffer

de corrida Tris-glicina 0,04 M (pH = 8,3). Los métodos de tinciones fueron: isoenzimas peroxidasas (Iglesias y col., 1974), isoenzimas polifenoloxidasas (Guedes y Rodríguez, 1974) e isoenzimas ascorbato oxidasas (Pasteur y col., 1987). El análisis genético se basó en las variables: número total de loci, total de bandas o alelos, total de alelos raros, valor medio de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos y valor medio de alelos por loci polimórficos. Se empleó el paquete de programa MAT-GEN para obtener la matriz de similitud, por el índice de Zcekanowski (Sigarroa y Cornide, 1995). Para el agrupamiento se utilizó el análisis de conglomerados.

Caracterización molecular:

Se colectaron hojas jóvenes de 18 cultivares referidos en la Tabla 1 para el aislamiento del ADN genómico, siguiendo el procedimiento sugerido por Doyle and Doyle, (1990) modificado por Rohde *et al.* (1995). Para la amplificación (PCR), se empleó la pareja de primer F_3 + B_2B (Rohde *et al.*, 1996) marcados con (g-^{33}P) ATP (Amersham-Pharmacia- Biotech). Se realizó la reacción de amplificación con el protocolo sugerido por Rohde *et al.* (1995) en un volumen final de 25 µl con 25 ng de DNA genómico, 200 µM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 1x PCR buffer (Gibco/BRL), 2.5 pmoles de cada primer, y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Gibco/BRL). El programa de amplificación consistió en los siguientes pasos: (1) 95°C/3min; (2) 95°C/ 30seg; (3) 45°C/30seg; (4) 72°C/2min; (5) 72°C/10min, con 40 ciclos entre los pasos 2 y 4. Después de la desnaturalización, se corrieron alícuotas de 2 µl en un gel de poliacrilamida al 4%. Se obtuvieron bandas visibles por autorradiografía. Se empleó el paquete de programa NTSYS-pc para obtener la matriz distancias y el agrupamiento se realizó a través de un análisis de conglomerados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de componentes principales realizado con las variables morfológicas seleccionadas permitió constatar que las dos primeras componentes extrajeron el 86,44% de la variación total, correspondiendo el 58,36% y el 28,08% para la primera y segunda componente, respectivamente. Las variables que más contribuyeron para la discriminación en la primera componente fueron el grosor y la flexibilidad de la cáscara del fruto y la época de cosecha, y en la segunda, el olor a anís en las hojas y el color de las lenticelas del vástago joven. En el gráfico de los componentes principales (Figura 1) puede notarse la formación de tres grupos. El primero compuesto por los aguacateros del Grupo Guatemalteco y la mayoría de los híbridos de Guatemalteco x Antillano, con excepción del cultivar Monroe (Estación) que se agrupó con los Antillanos (Grupo II). El cultivar Jaruco No.1, clasificado como Antillano (Lima *et al.*, 1988) quedó incluido en el Grupo I. Es posible que el mismo, conjuntamente con el Hass y el Miguel García, sean híbridos donde uno de los parentales pertenezcan al Grupo Guatemalteco, resultados que confirman los obtenidos por Clegg *et al.* (1999) para el caso específico del cultivar Hass. El Grupo III quedó constituido por el único representante de la raza Mexicana.

Los resultados obtenidos coinciden con los de Rodríguez *et al.* (2000) y demuestran la efectividad de las variables seleccionadas para el agrupamiento de los aguacateros según su grupo ecológico.

La Tabla 2 muestra las medidas de la variabilidad genética para los sistemas enzimáticos estudiados. Se obtuvo un total de 13 loci con 25 alelos y la presencia de alelos propios en cada sistema, los cuales pueden haberse originado por la ocurrencia de mutaciones (Martins- Corder *et al.*, 1996). Los resultados están en correspondencia con el sistema de reproducción dicogámico de esta especie, que provoca diferentes niveles de heterocigosidad en las poblaciones de aguacatero (Pliego-Alfaro y Bergh, 1992).

En el análisis de agrupamiento (dendrograma), se aprecia la formación de cinco grupos, de acuerdo a las afinidades genéticas entre los cultivares (Fig. 2). Las mayores similitudes se presentan para los de origen Antillano, el híbrido Monroe (Estación) y el cultivar Duque-7 de origen Mexicano, que constituyen de esta forma el Grupo I. Estos resultados ponen de manifiesto que la mayor variabilidad genética está contenida en los cultivares de origen Guatemalteco y algunos de los híbridos, ya que nueve de los once cultivares de origen Antillano, están incluidos en el primer Grupo.

A partir del análisis de ISTR se pudo detectar un total de 157 bandas, todas ellas polimórficas. Con el empleo de la combinación de primer señalada pudo distinguirse el 100% de los genotipos, cada uno caracterizado por un patrón de bandas específico. En el análisis de conglomerados, sin embargo, los grupos ecológicos presumibles no quedaron bien representados (Figura 3). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Mhameed *et al.*, (1997), pero contrastan con los de Clegg *et al.,* (1999). Este hecho puede deberse a diferentes razones: Primero, la clasificación de las razas está basada sobre caracteres morfológicos seleccionados de árboles y frutos; segundo, el ISTR explora polimorfismos en regiones no codificadoras del ADN (Ramírez *et al*., 2002) ; y tercero, el empleo de una sola pareja de primer.

Los resultados demuestran que con un único par de primer fue suficiente para distinguir todos los genotipos, lo que indica que este marcador genético puede resultar de utilidad para la certificación de variedades, para la detección de duplicados en las colecciones y para asistir programas de mejoramiento en el aguacatero (Ramírez *et al*., 2002).

BIBLIOGRAFÍA

CLEGG, M.T., M. KOBAYASHI AND J. ZHONG LIN. 1999. The use of molecular markers in the managment and improvement of avocado (*Persea americana* Mill.). Revista Chapingo Serie Horticultura 5:227-231.

DAVARSI, A. Y M. SOLLER 1994. Optimum spacing of genetic markers for determinig linkage between marker loci and quantitative trait loci. Theor Appl. Genet. 89:351-357.

DOYLE, J.J. AND DOYLE J.L., 1990. Isolation of plants DNA from fresh tissue. Focus12:13-15.

González, C., M.I. Roman, X. Xiques, J. Dueñas, R. Jimenez y N. Rodríguez 2002. Caracterización genetico-bioquimica de 20 cultivares de aguacate (*Persea.americana* Mill) en Cuba. Rev. Biología 6(1):49-55.

GONZÁLEZ, C. Y J. A. GONZÁLEZ 1981. Estudio de patrones para lima ´Persa´ III. Caracterización isoenzimática. Ciencia y Técnica en la Agricultura, Cítrico y otros Frutales 4(2):101-108.

GUEDES, A. AND C. J. RODRÍGUEZ 1974. Disc electrophoretic pattern of phenoloxidase from leaves of coffe cultivars. Sep. De Portugalial. Acta Biológica Serie A. Vol. XIII, p:169-177.

IGLESIAS, L.; H. LIMA AND J. P. SIMÓN 1974. Isozime identification of cigotic and nucellar seedlings in *Citrus*. J. Hered. 65:81-84.

LIMA, H., T. RIVERA, A. M. CABRERA Y O. L. RODRÍGUEZ 1988. Clasificación de cultivares de aguacatero (*Persea americana*) en grupos ecológicos. Ciencia y. Técnica en la. Agricultura. Citricos y otros Frutales (11):47- 53.

MARTINS-CORDER, M.A., E.S.MORI, P.Y. KAGEYAMA Y C.R.LOPES. 1996. Estudo da variabilidade isoenzimatica em Eucalyptus urophylla das ihas flores. Scientia Forestalis 50: 43-49.

MHAMEED, S., D. SHARON, D. KAUFMAN, E. LAHAV, J. HILLEL., C. DEGANI. AND U. LAVI 1997. Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill.) cultivars and between *Persea* species. Theor. Appl. Genet. 94:279-286.

PASTEUR, N., G. PASTEUR, F. BONHOMME Y J. CATALÁN. 1987. Interpretation genetique des zymogrammes. Mannuel Technique de Genetique par electrofhorese des proteines. Technique et Documentation (Lavoisier).

PLIEGO-ALFARO, F. Y B. O. BERGH. 1992. Biotecnology of perennial fruit crops. Chapter 13: Avocado. Ed. Hammers-Chlag, F. A. y R.E. Litz. CAB International: 323-334.

RAMÍREZ, I. M., J. L. FUENTES, N. N. RODRÍGUEZ, J. R. CUETO AND W. ROHDE 2002. DNA polymorphic in Cuban varieties of avocado (*Persea americana* Mill.) as detected by Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR) analysis. Cultivos Tropicales 23(3):88'85.

RODRÍGUEZ, N. N., G. GONZÁLEZ, A. SIMÓN, H. LIMA, C. GONZÁLEZ, R. JIMÉNEZ, O. MAS Y M. MORENZA. 2000. Recursos genéticos del aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. II. Agrupación de cultivares en sus grupos ecológicos a través de marcadores morfológicos y bioquímicos. Citrifrut 18(1,2 y 3):23-32.

ROHDE, W., A. KULLAYA, J. RODRÍGUEZ. AND E. RITTER 1995. Genetic analysis of *Cocos nucífera* L. by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of copia-like Eco RI repetitive elements. J. Genet. & Breed. 49: 179-186.

ROHDE, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis: a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kigdom. J. Genet & Breed 50:249-261.

SIGARROA, A. Y M. T. CORNIDE. 1995. Paquete de Programas MAT-GEN. Manual del Usuario, Facultad de Biología, 23 p.

STAUB, J. E., L. J. KUHNS, B. MAY Y P. GRUN. 1982. Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107: 405-408.

Tabla 1. Relación de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) estudiados y de sus grupos ecológicos presumibles.

NÚMERO DE ORDEN	CULTIVAR	GRUPO ECOLÓGICO PRESUMIBLE
1	Amado Gómez No. 1	A
2	California	G
3	Casimiro	A
4	Catalina	A
5	Centro América No. 3	G
6	CH 1 No. 3	A
7	Chavao No. 3	A
8	Choquette	G x A
9	Cueto	A
10	Duke 7	M
11	Hass	?
12	Itzamna	G
13	Jaruco No. 1	A
14	José Antonio	A
15	Los Moros	A
16	Lula	G x A
17	Miguel García	?
18	Monroe (Estación)	G x A
19	Sicilia No. 6	A
20	Suardía	G
21	Wilson Popenoe	A

A –Antillanos; G –Guatemaltecos; M –Mexicanos; G x A – Híbridos de Guatemalteco y Antillano

Tabla 2. Medidas de la variabilidad genética en cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) para los sistemas enzimáticos estudiados.

Sistemas	No. Loci	No. Alelos	No. Alelos Propios	Media Alelos/Locus	% Loci Polimórficos	Media Alelos/Loci Polimórficos
PX	6	10	1	1,5	100	1,5
PPO	4	8	1	1,7	75	2
AO	3	7	1	2	100	2
TOTAL	**13**	**25**	**3**	**1,7**	**90,2**	**1,7**

PX –Peroxidasas
PPO –Polifenoloxidasas
AO –Ascorbato oxidasas

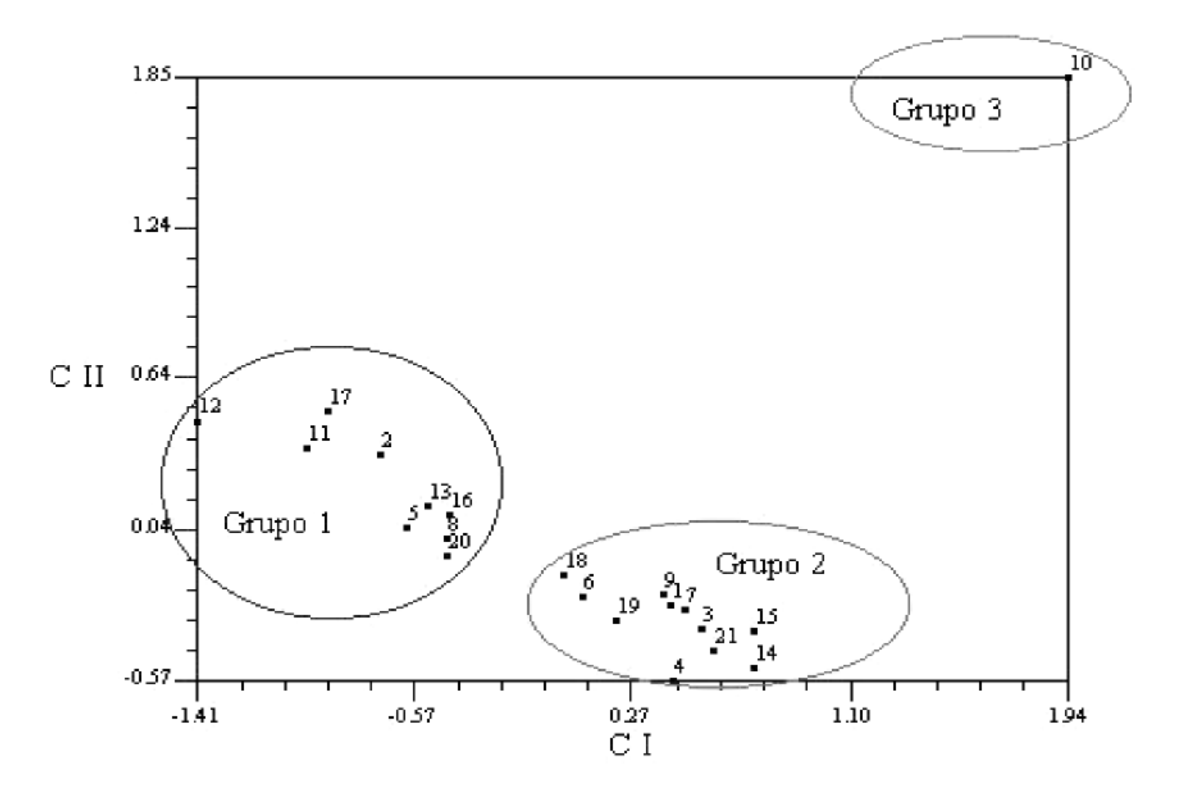


Figura 1. Agrupamiento de cultivares de aguacatero a través del análisis de componentes principales, utilizando caracteres morfológicos.

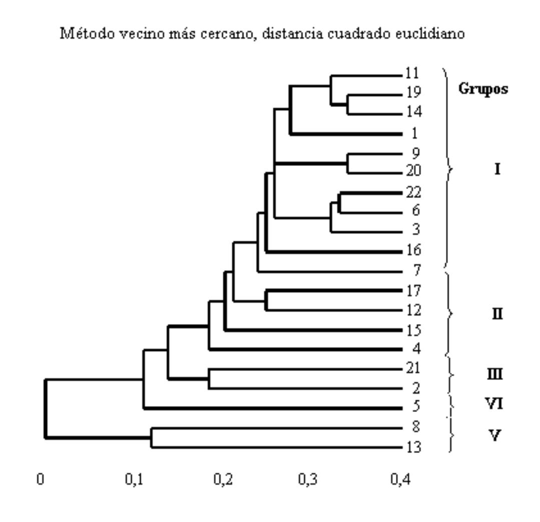


Figura 2. Dendrograma que ilustra la agrupación de los cultivares de aguacatero a través de caracteres bioquímicos.

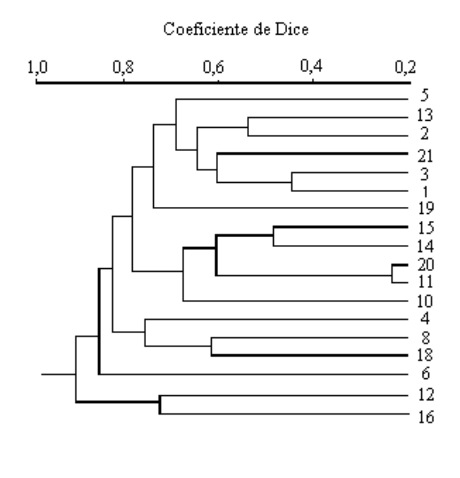


Figura 3. Dendrograma que ilustra la agrupación de los cultivares de aguacatero a través del marcador ISTR.